

## 通过毛细管 HPLC-ICP-MS 分析微升体积的植物汁液中锌的形态

### 应用简报

环境

#### 作者

Paulina Flis、Laurent Ouerdane、  
Ryszard Lobinski

CNRS-UPPA, Laboratoire de  
Chimie Analytique Bio-inorganique  
et Environnement, UMR5254,  
Hélioparc, 2, Av. Angot, 64053 Pau,  
France



#### 前言

许多金属元素对于正常的植物生长和发育非常重要。其中一种金属元素就是锌，它通常是生物体中第二丰富的过渡金属，并且作为重要的微量营养元素在植物生理学中发挥着不同的作用。锌是 300 多种酶的主要成分。它负责基因调控和蛋白质结构的稳定，包括锌指、锌簇和 RING 指结构域。锌还参与光合作用和 CO<sub>2</sub> 固定等基本过程。植物中的锌过量或缺乏将导致植物死亡率高、生长迟缓和萎缩、萎黄病、坏死、小叶病和开花延迟。所有这些症状都可能对食品安全产生严重影响，因为与锌可利用性相关的作物产量将显著降低 [1-3]。

Agilent 7800 ICP-MS  
已得到验证



Agilent Technologies

通过鉴定植物汁液中存在的低分子量含金属化合物，有助于更深入地了解植物生理学，并且确定其准确的功能，这将进一步促进营养、农业和环境研究。然而，复杂生物基质如植物样品的研究可能在样品前处理或色谱分离过程中存在若干问题。主要的挑战与金属配合物的低浓度及其多样性有关。此外，金属配合物通常不稳定，能够在萃取、离线预浓缩步骤、甚至色谱分离中发生降解。在迄今为止所研究的色谱技术中，体积排阻色谱 (SEC)、亲水相互作用色谱 (HILIC) 和反相 (RP) 色谱已被证明是最适合避免金属配合物在分析过程中发生降解的技术 [4]。由预浓缩柱和 HILIC 或 RP 分离柱组成的色谱系统似乎是此类应用的理想选择。

本研究提出一种 ICP-MS 辅助的金属组学方法用于分离豌豆后韧皮部中存在的锌形态分析。通过具有在线预浓缩功能的毛细管 HPLC-ICP-MS 对胚囊液体进行分析。由于植物汁液量非常少，所以需要使用毛细管色谱。

## 实验部分

### 样品

本文对来自发育中的豌豆豆荚（嫩豌豆）的胚囊液体（后韧皮部）进行了研究。

### 样品前处理

用玻璃毛细管在豆荚中穿孔，使用蠕动泵提取液体胚乳，将其放入保存在冰上的 Eppendorf 管中。收集完成后，立即将样品置于液氮中冷冻，并在进一步分析之前将其置于 -20 °C 的温度下储存。在分析之前，将样品解冻，并用乙腈按 1:2 的比例（样品：乙腈）进行稀释，然后在 10000 rpm 的转速下离心 2 分钟。收集上清液并立即进行分析。

## HPLC-ICP-MS 系统

使用配备毛细管泵和手动进样阀（定量环尺寸：100  $\mu$ L）的 Agilent 1100 液相色谱仪。将 30  $\mu$ L 上清液进样至 SeQuant 两性离子型 (ZIC-) HILIC 保护柱（Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 5 mm  $\times$  1 mm（内径），5  $\mu$ m）中，使用 90% 乙腈和 10 mM 甲酸铵缓冲液 (pH 5.5) 进行等度洗脱 (20  $\mu$ L/min)。用流动相将样品清洗 4 min，然后反冲至用于化合物分离的 SeQuant ZIC-HILIC 毛细管柱（Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 150 mm  $\times$  0.3 mm（内径），3.5  $\mu$ m）。使用洗脱液 A（10 mM 甲酸铵缓冲液 (pH 5.5)）和洗脱液 B（乙腈），进行流速为 4  $\mu$ L/min 的梯度洗脱。梯度程序见表 1。

表 1. HPLC 洗脱程序

步骤	洗脱液 [%B]	时间 [min]
1	90	0-5
2	90-65	5-17
3	65-52	17-47
4	52-35	47-53
5	35	53-65
6	35-90	65-70
7	90	70-75

## HPLC-ICP-MS 和 ESI-MS/MS

将分离柱的出口连接至 Agilent 7700x ICP-MS（通过 Agilent capLC 接口，G3680A，图 1）或 ESI-MS/MS。

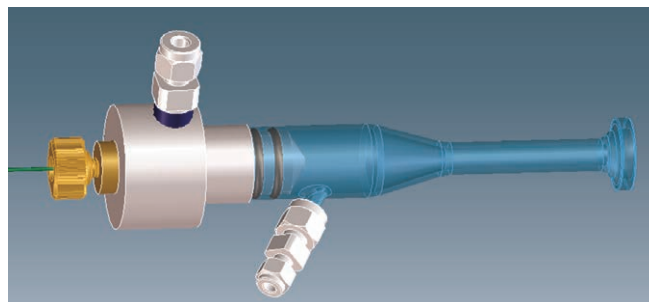


图 1. 安捷伦毛细管液相色谱接口套件 (G3680A)，其包括小型石英雾化室内部的总消耗型雾化器

使用含有 20 ppb Y、Li、Tl、Ce 溶于 2% 硝酸中的调谐溶液，在每天开始时自动对 ICP-MS 条件进行优化。7700x 的 ORS<sup>3</sup> 碰撞/反应池在高能量氦模式下操作，以排除可能出现于 Zn 同位素中的多原子干扰。使用 60 ms 的驻留时间采集 <sup>64</sup>Zn 和 <sup>66</sup>Zn 的信号。ICP-MS 操作条件见表 2。

表 2. Agilent 7700x ICP-MS 操作条件

参数	值
雾化器/雾化室	毛细管液相色谱接口 G3680A
炬管内径	1 mm
接口锥	铂
RF 功率	1560 W
采样深度	7.5 mm
载气流速	0.78 L/ min
可选气体 (O <sub>2</sub> ) 流速	0.04 L/ min
<b>透镜</b>	
提取电压 1	2.7 V
提取电压 2	-180 V
<b>反应池</b>	
八极杆偏置电压	-100 V
氦气流速	10 mL/ min
动能歧视	7 V

ESI LTQ Orbitrap Velos 质谱仪在正离子模式下操作，毛细管电压为 3.0 kV。将离子源的蒸发器温度设置为 120 °C，并将毛细管温度设置为 280 °C。全扫描 MS 模式的分辨率设置为 100000 (*m/z* 400 处的 FWHM)。

## 结果与讨论

获得的嫩豌豆后韧皮部的 <sup>64</sup>Zn 的色谱图如图 2 所示。使用具有在线预浓缩功能的毛细管 ZIC-HILIC ICP-MS 使我们能够获得尖锐的高强度色谱峰，并对两种锌形态进行分离和检测 (图 2a 和 2b)。使用 ESI Orbitrap MS/MS 鉴定两种金属配合物。ICP-MS 检测对于测定不同锌形态的保留时间和估计质量平衡至关重要。这简化了在 ESI-MS 质谱图中搜索锌配合物的步骤。质谱图的放大部分 (图 2d 和 2e) 清晰地显示了两种包含锌的同位素模式的离子。这些提取离子色谱图 (EIC) 的保留时间与通过毛细管

ZIC-HILIC ICP-MS 观察到的两个锌的峰 (图 2c) 具有良好的 consistency。获得的数据使我们能够鉴定两种锌配合物：锌-烟草胺 (NA) 和锌-(组氨酸)<sub>2</sub> (表 3)。

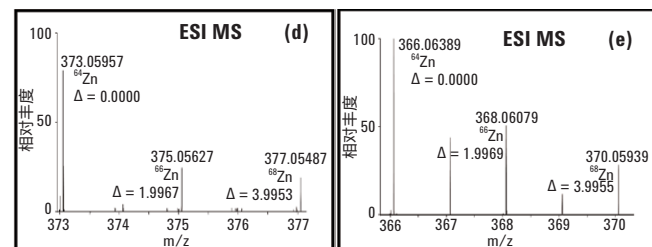
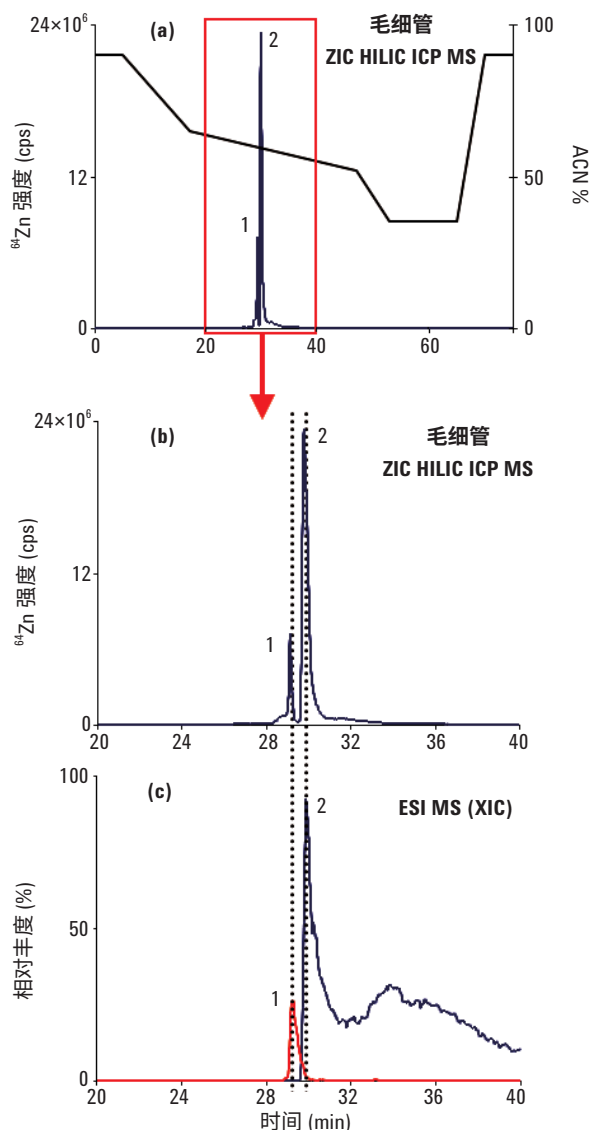


图 2. 通过 a) 毛细管 ZIC-HILIC-ICP-MS; b) 毛细管 ZIC-HILIC-ICP-MS 一色谱图部分放大图; c) 毛细管 ZIC-HILIC-ESI-MS (选择离子色谱图) 获得的色谱图。d) 和 e) 是 ESI-MS 谱图中包含锌同位素模式部分的放大图

表 3. 从豌豆（嫩豌豆）的后韧皮部中鉴定出的含锌配合物的列表

	峰 1	峰 2
配体	组氨酸	烟草胺
配合物	(His) <sub>2</sub> -Zn	NA-Zn
分子式（中性形态）	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> N <sub>6</sub> Zn	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub> Zn
理论质量数	373.05973	366.06381
实验质量数	373.05957	366.06389
Δ (ppm)	-0.437	0.216

由毛细管 HPLC 和 ICP-MS 组成的色谱系统使我们获得的 <sup>64</sup>Zn（约 6 fmol 的 Zn-NA 配合物）的检测限为 75 ng/L，该检测限是由基线上 20 个点的标准偏差的 3 倍计算得到。将该数值与 Zn-NA 配合物的信号进行比较，所获得的 <sup>64</sup>Zn 的色谱柱回收率为 70-80%。


## 结论

本研究展示了一种有效的 ICP-MS 辅助的金属组学方法，用于分离和鉴定存在于豌豆后韧皮部中的锌配合物。使用 ZIC-HILIC 预柱对锌形态进行预浓缩，然后通过 ZIC-HILIC 毛细管柱进行分离。通过毛细管 HPLC 与 ICP-MS 和 ESI MS/MS 仪器联用获得的数据组合可用于鉴定不同的锌配合物。由于植物汁液量非常少，所以需要使用毛细管色谱。另外，具有在线预浓缩功能的色谱系统非常适用于分析包含低浓度金属形态（其有时也不稳定）的生物样品。本方法已成功用于鉴定两种锌形态：锌-烟草胺 (NA) 和锌-(组氨酸)<sub>2</sub> 配合物，证明 NA 和组氨酸是嫩豌豆后韧皮部中的两种与锌形成配合物的主要配体。

## 参考文献

1. M.R. Broadley, P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, A. Lux, *New Phytologist*, 2007, 173, 677-702
2. T.C.Fox, M.L. Guerinot, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, 49, 669-696
3. C.A. Blindauer, R. Schmid, *Metallomics*, 2010, 2, 510-529
4. L. Ouerdane, S. Mari, P. Czernic, M. Lebrun, R. Lobinski, *JAAS*, 2006, 21, 676-683

**Agilent 7800 ICP-MS**  
已得到验证



本档中列出的结果均由 7700x 获得，但经验证后得知性能参数同样适用于 7800 ICP-MS。

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017  
2017 年 7 月 4 日，中国出版  
出版号：5991-2415CHCN